



核酸适配体介导的肿瘤免疫治疗研究进展*

周灵丽 叶 茂**

(湖南大学生物学院, 长沙 410082)

摘要 肿瘤免疫治疗是一种新的肿瘤治疗方式, 在临床治疗中具有重要意义和应用前景, 主要包括过继性细胞免疫治疗、肿瘤疫苗和抗体肿瘤免疫治疗。抗体在肿瘤免疫治疗中应用广泛, 但其价格昂贵, 质量易受不同批次的影响且存在免疫原性。核酸适配体 (aptamer) 是一类能与靶标高特异性高亲和力结合的短的单链寡核苷酸, 素有“化学抗体”之称。核酸适配体易合成且成本低, 质量稳定且免疫原性低, 基于这些优势近年来也被开发用于肿瘤免疫治疗。本文综述了核酸适配体在肿瘤免疫治疗中的进展, 主要包括核酸适配体通过靶向免疫检查点、共刺激受体、细胞因子、递送小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 间接调控肿瘤免疫进程, 以及将核酸适配体修饰于细胞膜上直接介导免疫细胞靶向杀伤等。核酸适配体以多种方式在肿瘤免疫治疗中发挥作用, 有潜力被开发用于临床治疗。

关键词 核酸适配体, 肿瘤免疫治疗, 免疫检查点, 共刺激受体, 双特异性核酸适配体

中图分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0195

近年来随着肿瘤免疫学理论和生物技术的发展, 肿瘤治疗方式不再局限于传统的手术治疗、放疗和化疗, 免疫治疗已成为克服肿瘤的一种新方法。从2011年《自然》(Nature) 期刊宣称“免疫治疗的时代已经到来”, 到2018年将诺贝尔生理或医学奖授予美国的詹姆斯·艾莉森 (James P Allison) 与日本的本庶佑 (Tasuku Honjo) 以表彰他们在人类肿瘤免疫治疗方面的贡献, 都意味着不断发展的免疫治疗将成为肿瘤治疗的重要手段^[1]。抗体类药物是肿瘤免疫治疗的主要方式并在临床上广泛应用, 但抗体价格昂贵、免疫原性高、存在引起细胞因子风暴的风险。具有“化学抗体”美称的核酸适配体特异性高、易合成且价格实惠、免疫原性低且体内应用更安全, 因此在肿瘤免疫治疗中具有较好的应用前景。

1 肿瘤免疫治疗

免疫系统包括先天性免疫和适应性免疫。先天性免疫系统的免疫细胞负责吞噬杀灭外来病原体, 识别与杀死受损内源细胞。而由体液免疫和细胞免疫组成的适应性免疫系统则通过产生特异性抗体来保护机体, 或通过抗原特异性的细胞毒性T细胞直

接杀死病变细胞^[2]。肿瘤免疫治疗则通过激活机体免疫系统, 克服肿瘤微环境的免疫抑制作用来增强抗肿瘤免疫应答能力。现阶段肿瘤免疫治疗手段主要包括: 肿瘤疫苗、过继性细胞免疫治疗以及抗体治疗等^[3]。肿瘤疫苗主要利用肿瘤细胞、肿瘤抗原以及编码抗原的核酸等, 诱导机体产生特异的抗肿瘤免疫效应, 按功能可以分为预防性疫苗和治疗性疫苗, 例如2006年美国食品药品监督管理局 (food and drug administration, FDA) 批准首款人乳头状瘤病毒疫苗 Gardasil 用于预防宫颈癌, 于2010年批准了首款树突状细胞疫苗 Sipuleucel-T 用于治疗转移性前列腺癌^[4-5]。而过继性细胞免疫治疗是指将自体或异体T细胞或NK细胞在体外激活后, 回输到体内发挥抗肿瘤免疫作用。其中基于抗原抗体的特异性识别作用, 使用基因编辑技术构建的嵌合抗原受体T细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 药物 Kymriah 和 Yescarta 已获批上

* 国家自然科学基金 (81672760) 和湖南省重点研发计划 (2018SK2128) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-88821834, E-mail: goldleaf@hnu.edu.cn

收稿日期: 2021-07-05, 接受日期: 2021-08-09

市被用于治疗复发或难治性急性B系淋巴细胞白血病和大B细胞淋巴瘤。肿瘤免疫治疗中应用最广泛的方式是抗体治疗, 利用抗体靶向肿瘤相关抗原, 靶向免疫检查点分子或共刺激受体来调控机体免疫系统。其中靶向免疫检查点的单克隆抗体药物在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用, FDA共批准了7种免疫检查点抑制剂类药物用来治疗癌症, 包括1款靶向细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4) 的单抗和6款针对程序性死亡蛋白1 (programmed cell death 1 receptor, PD-1) 及其配体程序性死亡蛋白配体1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 的单抗^[6]。这些抗体类药物虽能有效发挥抗肿瘤作用, 但大部分患者在使用过程中面临药物不响应的问题, 只对小部分患者有用, 且在重复给药的治疗过程中会产生耐药性, 同时也面临自身免疫毒性风险^[7]。

2 免疫相关核酸适配体的筛选

核酸适配体作为新型靶向配体也可以通过结合免疫相关受体调控机体的抗肿瘤免疫反应, 有望在

肿瘤免疫治疗领域发挥作用。核酸适配体是指通过指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 从人工合成的寡核苷酸文库中筛选得到的能与靶标特异结合的一小段 ssDNA 或者 ssRNA 序列, 筛选流程如图1。核酸适配体可以折叠成特定的二级或三级结构、通过氢键、疏水作用力、范德华力等非共价作用力与小分子、多肽、蛋白质、病毒、细胞、细菌甚至组织等靶标特异结合^[8]。基于此, 核酸适配体已成为疾病诊断和靶向治疗的有力工具, 例如: 2004年, 第一个核酸适配体药物 Macugen 被FDA批准用于治疗老年性黄斑变性^[9]。2019年, 由香港浸会大学研究团队研发的骨硬化蛋白核酸适配体药物 (DRU-2019-6966) 已通过FDA授予孤儿药认证, 用以治疗成骨不全症。已有研究表明核酸适配体可作为肿瘤相关抗原、免疫检查点分子、共刺激受体、细胞因子的新型靶向配体直接用于肿瘤免疫治疗, 也可以与药物、siRNA、纳米材料偶联, 或将核酸适配体修饰于细胞膜表面来发挥抗肿瘤作用。表1总结了在肿瘤免疫治疗中发挥作用的核酸适配体。

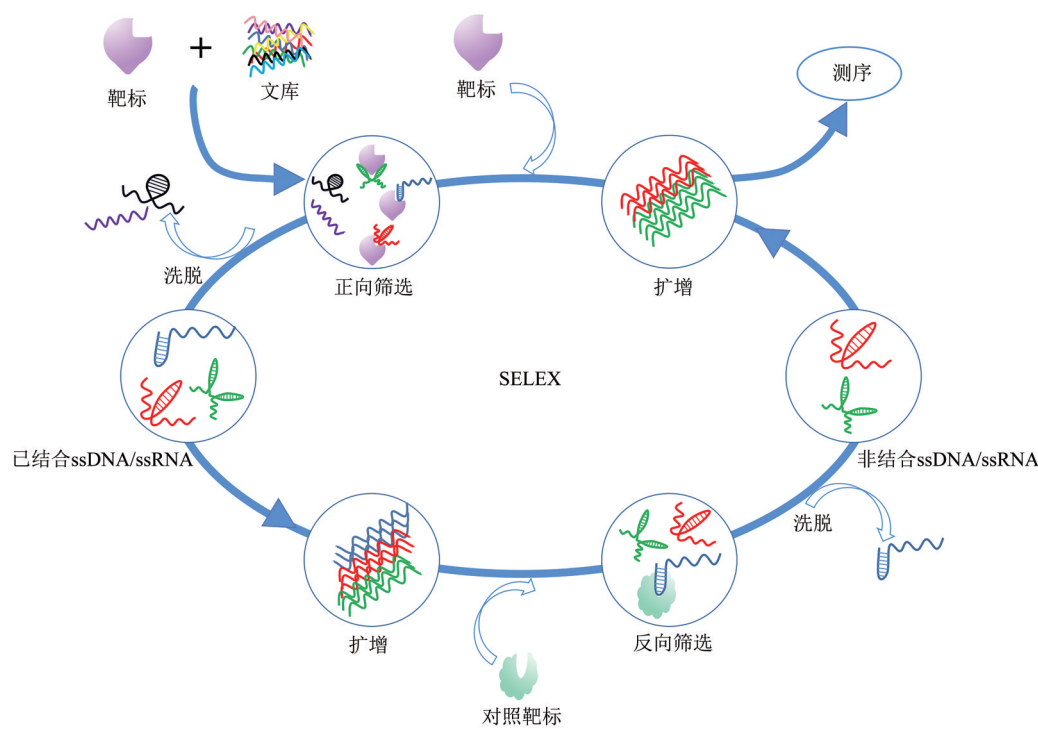


Fig. 1 Schematic presentation of the typical procedure for aptamer selection
图1 核酸适配体筛选模式图

首先设计合成随机单链DNA或RNA文库, 并将文库与靶标孵育。再利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增与靶标结合的核酸适配体并与对照靶标孵育。然后利用PCR扩增未与对照靶标结合的核酸适配体作为下一轮筛选的初始文库。最后将经8~20轮筛选后富集的文库进行测序。

2.1 靶向免疫检查点的核酸适配体

免疫检查点分子是一类免疫活性调控受体,如免疫抑制性受体 CTLA-4 和 PD-1 在肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中明显过表达,通过触发免疫抑制信号传导途径导致肿瘤免疫逃逸^[7]。而靶向抑制免疫检查点分子,重新激活细胞毒性T细胞被称为免疫检查点封锁,是一种触发抗肿瘤免疫反应的有效手段。

2003年,首次筛选到能靶向结合免疫受体 CTLA-4 的 RNA 核酸适配体 Del 60,并发现 Del 60 能抑制 CTLA-4 增强小鼠的抗肿瘤免疫反应^[10]。核酸适配体在肿瘤免疫治疗领域崭露头角,使得大批科研人员开始致力于筛选具有功能的免疫相关核酸适配体,期望利用核酸适配体进行肿瘤免疫调控。随后发现的靶向 CTLA-4 的 DNA 核酸适配体 aptCTLA-4 能促进 T 细胞增殖,且其肿瘤抑制效果与 CTLA-4 单抗相媲美,并未见明显肝肾毒性,具有良好临床应用前景^[11]。

PD-1/PD-L1 轴是涉及肿瘤免疫逃逸的主要途径之一,靶向结合鼠 PD-1 蛋白的 DNA 核酸适配体 MP7 拮抗 PD-1/PD-L1 的结合并减弱 PD-L1 对原代 T 细胞分泌白介素-2 (interleukin-2, IL-2) 的抑制作用。MP7 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 化形式的半衰期更长,其抗肿瘤作用与 PD-1 抗体不相上下^[12]。利用人 PD-1 重组蛋白筛选出的 XA-PD-1-78 具有与 PD-1 抗体相似的结合功能,但却不具有生物学功能^[13]。最近针对人 PD-1 蛋白又筛选出两条核酸适配体,分别是 C42 和 PD4S,其中 C42 是通过杂交 SELEX 筛选而来,即先进行蛋白质筛选再利用高表达 PD-1 的 Jurkat 细胞进行细胞筛选。C42 虽然能很好地结合天然构象的 PD-1 蛋白,但却不能诱导 CD8⁺ T 细胞增殖和细胞因子产生^[14]。而利用 cell-SELEX 筛选得到的 PD4S 适配体可以解除 PD-1/PD-L1 轴对 T 细胞的免疫抑制作用,且经胆固醇修饰后的 PD4S 具有更好的生物稳定性,在 CT26 肿瘤模型中显示出较好的抗肿瘤作用^[15]。近年来,针对 PD-L1 蛋白也筛选了许多核酸适配体,例如核酸适配体 aptPD-L1 能特异性结合 PD-L1 从而调节 TME,增加浸润性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,使肿瘤内 IL-2、肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和 C-X-C 基序趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 的水平升高从而抑制体内肿瘤的生长^[16]。最近,通过 cell-SELEX 筛选得到了核酸适配体 XQ-P3 和 PL1,其中 XQ-P3 高

亲和力结合 PD-L1,且在体外能激活 T 细胞的免疫功能^[17]。而 PL1 能诱导 T 细胞的增殖和 IFN- γ 的释放,有效抑制 CT26 结肠癌的生长^[18]。天然核酸在机体内容易被核酸酶所降解,需要对筛选得到的核酸适配体进行修饰来提高其稳定性或者在筛选前就对文库进行修饰。从一种含有非天然糖环苏糖核酸 (TNA) 文库中筛选得到的 TNA 适配体 N5 阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的效果优于 AptPD-L1 且稳定性好。N5 能特异性地聚集在结肠癌异种移植小鼠肿瘤部位抑制肿瘤生长,有潜力发展为免疫治疗药物^[19]。PD-1/PD-L1 轴的信号阻断治疗方式的前提是肿瘤组织中 PD-L1 的高表达,目前主要利用 PD-L1 抗体来检测肿瘤组织中 PD-L1 的表达水平,但是抗体因批次不稳定其检测结果也受到影响。核酸适配体在检测方面同样可以与抗体竞争,例如 PD-L1 的核酸适配体 XA-PDL1-82 和 Clon-3,其中 XA-PDL1-82 可以检测胰腺癌肿瘤细胞、组织切片上 PD-L1 的表达^[13],而通过 Modular-SELEX 筛选得到的 Clon-3 不仅可以检测各种肿瘤细胞、组织切片中 PD-L1 的表达,而且检测结果稳定,有望用于临床检测^[20]。

CTLA-4 或 PD-1/PD-L1 信号途径的阻断只对部分癌症患者有效,针对其他免疫检查点受体进行阻断治疗也具有重要意义,例如 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (T-cell immunoglobulin mucin 3, TIM-3) 和淋巴细胞激活基因 3 (lymphocyte activation gene-3, LAG3)^[21]。TIM-3 和 LAG3 在衰竭的 T 细胞中与 PD-1 一起表达,已筛选的 TIM-3 核酸适配体的三聚体形式能比 TIM-3 抗体更有效的抑制 CT26 小鼠模型肿瘤的生长^[22]。LAG3 RNA 核酸适配体可促进 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的活化与增殖^[23]。

2.2 靶向免疫共刺激受体的核酸适配体

T 细胞表面除表达免疫抑制性受体外还表达免疫共刺激受体,两者共同调控 T 细胞的免疫反应。大多数参与免疫反应的受体都需要交联形成二聚或多聚体来启动信号级联,因此推测二聚或多聚体形式的核酸适配体更有可能激活共刺激受体。共刺激分子包括 B7/CD28 和 TNF 两大家族,其中 4-1BB、OX40 和 CD40 属于 TNF 家族成员,而 CD28 是负责 T 细胞正常活化的共刺激受体,属于 B7/CD28 家族。已筛选得到的 4-1BB 核酸适配体的二聚或多聚形式才能激活 4-1BB 受体,诱导 T 细胞活化^[24]。类似的,靶向鼠 OX40 的 RNA 适配体的二聚化形

式能激活 T 细胞, 与树突状细胞疫苗联用提高了黑素瘤小鼠的存活率^[25]。靶向人 OX40 的核酸适配体的多价形式能促进 T 细胞增殖, 刺激 IFN- γ 的产生^[26]。CD40Apt3 是能特异性靶向 CD40 的 2'-氟 RNA 核酸适配体且被证明能抑制 B 淋巴瘤细胞的增殖, 抑制肿瘤生长^[27]。此外, 筛选到两种靶向鼠 CD28 的 RNA 核酸适配体 CD28Apt2 和 CD28Apt7, 发现 CD28Apt7 二聚体的共刺激作用比 CD28Apt2 二聚体更好, 而 CD28Apt2 二聚体的作用与抗 CD28 抗体相似, 都能增强体液和细胞免疫应答^[28]。

2.3 靶向细胞因子的核酸适配体

细胞因子作为免疫细胞交流的信息分子, 在肿瘤的发生发展和治疗中发挥关键作用。IL-8 又称为趋化因子 CXCL8, 对嗜中性粒细胞起有效的趋化作用。研究表明血清中 IL-8 的浓度与肿瘤大小、浸润深度以及肿瘤的发展阶段有关, 而嗜中性粒细胞的积累与癌症患者不良预后也存在相关性。这说明

在 TME 中阻滞 IL-8 信号传导可能是治疗癌症的有效策略。IL-8 核酸适配体 8A-35 能有效抑制 IL-8 诱导的嗜中性粒细胞活化和趋化, 而 IL-8 核酸适配体 8A-44 则能抑制 IL-8 诱导的口腔癌细胞侵袭^[29]。

TME 中的癌相关成纤维细胞所表达的趋化因子 CXCL12 是 TME 驱动的免疫抑制的关键。CXCL12 与其受体 CXCR4 和 CXCR7 的表达在许多类型的癌症中均上调, 核酸适配体 NOX-A12 以高亲和力结合 CXCL12 并阻碍其与受体 CXCR4/CXCR7 相互作用, 从而抑制肿瘤血管生成并抑制肿瘤生长、侵袭及转移^[30]。研究表明用 NOX-A12 处理可延长经放射治疗后的胶质母细胞瘤大鼠的寿命^[31]。NOX-A12 打破了 TME 的免疫特权状态, 增加了肿瘤处 T 细胞和 NK 细胞的浸润, 与 PD-1 检查点抑制剂联合治疗效果更好^[32]。NOX-A12 目前正处于 II 期临床研究阶段, 有望发展为肿瘤免疫治疗药物^[33]。

Table 1 Aptamers used in tumor immunotherapy
表1 肿瘤免疫治疗相关核酸适配体

类型	靶标	核酸适配体名称	作用	文献
免疫检查点	CTLA-4	Del 60	拮抗	[10-11]
		aptCTLA-4		
	PD-1	MP7	拮抗	[12,15]
		PD4S		
		XA-PD-1-78		
	PD-L1	C42	/	[13-14]
		aptPD-L1		
		XQ-P3		
		PL1		
		N5		
		XA-PDL1-82		
共刺激受体	TIM-3	Clon-3	检测PD-L1蛋白表达水平	[13,20]
		TIM3Apt		
		LAG3 Apt1		
		LAG3		
	4-1BB	M12-23	拮抗	[22]
		OX40		
		OX40-apt		
		CD40		
	CD40	CD40Apt3	激活	[24]
		CD28		
细胞因子	CD28	CD28Apt2	激活	[25]
		CD28Apt7		
		IL-8		
		8A-44		
	CXCL12	8A-35	拮抗	[26]
		NOX-A12		

2.4 靶向免疫细胞的核酸适配体

近年来已通过 cell-SELEX 筛选出许多特异性

结合不同肿瘤细胞的核酸适配体为癌症的检测和治疗提供了新的途径, 针对不同免疫细胞是否也能筛

选到相应核酸适配体, Pun等^[34]也进行了探索。他们筛选到能特异性结合CD8⁺T细胞的核酸适配体A3t, 利用表面结合A3t的磁珠以及与A3t互补的寡核苷酸链就可以从外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中无痕分选出CD8⁺T细胞用于制备CAR-T细胞。该团队还试图筛选仅与M2样巨噬细胞结合的核酸适配体, 但可能因为M0、M1和M2样巨噬细胞表面有较多相同的受体, 筛选得到的核酸适配体A2并不能特异性结合M2样巨噬细胞。令人意外的是, 发现A2只与CD14⁺单核细胞结合, 而不与CD16⁺单核细胞结合, 因此可以将A2适配体与磁珠联用以分离PBMC中的CD14⁺单核细胞^[35]。

3 核酸适配体介导的肿瘤免疫治疗

3.1 双特异性核酸适配体

双特异性核酸适配体通过识别同一细胞上两种不同靶标或识别两种细胞上的不同靶标, 影响细胞免疫应答或介导肿瘤细胞与免疫细胞间的相互作用。PSMA-4-1BB双特异性核酸适配体由4-1BB核酸适配体与靶向前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)的核酸适配体PSMA缀合形成, 通过PSMA的靶向作用使4-1BB在肿瘤处共刺激T细胞进行免疫应答, 减少因全身非特异性免疫激活产生的毒副作用^[36]。但PSMA与许多受体一样会在配体结合后迅速内化, PSMA-4-1BB在靶向结合PSMA的同时也会被内化至肿瘤细胞, 导致4-1BB核酸适配体来不及结合并共刺激T细胞上的4-1BB受体。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是TME中血管形成最重要的生长因子, 将4-1BB核酸适配体与VEGF核酸适配体缀合形成VEGF-4-1BB双特异性核酸适配体可以对肿瘤浸润性T细胞进行共刺激, 避免了双特异性核酸适配体内化进入肿瘤细胞^[37]。此外, 针对肿瘤化疗耐药相关的多药耐药相关蛋白1(multidrug related protein 1, MRP1)合成了MRP1-CD28双特异性核酸适配体。MRP1-CD28双特异性核酸适配体能够在富含肿瘤干细胞的黑色素瘤模型中为浸润淋巴细胞提供CD28共刺激, 诱导T细胞增殖, 抑制肿瘤生长, 提高肿瘤小鼠的存活率^[38]。

自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)是免

疫系统中的有力武器。c-Met是与肿瘤相关的抗原, c-Met-CD16 α 双特异性核酸适配体将NK细胞募集到过表达c-Met的肿瘤处并诱导ADCC^[39]。CD16在NK细胞、T细胞、单核细胞和巨噬细胞等免疫细胞中表达, 而黏蛋白1(mucin1, MUC1)是在腺癌中过表达的肿瘤标志物。MUC1-CD16双特异性核酸适配体可将CD16⁺免疫细胞募集到MUC1⁺肿瘤细胞处, 诱导免疫细胞的特异性杀伤^[40]。

为了提高双特异性核酸适配体的稳定性, 研究人员开发了环状双特异性适配体, 将能够特异性识别幼稚T细胞膜表面高表达的CD62的适配体LD201t1分别与适配体sgc8、TE02和PD-L1形成的环状特异性适配体, 可以分别特异性结合CCRF-CEM细胞、Ramos细胞或B16肿瘤细胞, 帮助幼稚T细胞识别相应肿瘤细胞并聚集在肿瘤处, 随后用T细胞CD3/CD28激活磁珠原位激活T细胞, 可实现对肿瘤细胞的精准靶向杀伤。此外, 通过简单的选择靶向不同肿瘤细胞的适配体就可以将该策略应用于不同癌症的靶向治疗^[41]。

3.2 核酸适配体靶向递送siRNA

核酸适配体靶向递送siRNA可减少脱靶效应, 增强siRNA的治疗效果。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是免疫记忆诱导的关键检查点, 可促进活化的CD8⁺T细胞分化为短暂的效应T细胞, 减少记忆性T细胞分化, 产生有效但短暂的免疫应答。4-1BB共刺激受体主要在CD8⁺T细胞上表达, 将4-1BB核酸适配体与靶向mTORC1的siRNA缀合, 可抑制CD8⁺T细胞分化为短暂的效应T细胞, 诱导分化为CD8⁺记忆T细胞, 提高疫苗接种小鼠的保护性抗肿瘤免疫力^[42]。CD25表达降低可抑制IL-2信号转导从而诱导记忆CD8⁺T细胞的产生, 因此将靶向CD25的siRNA与4-1BB核酸适配体缀合, 下调CD25, 诱导分化为CD8⁺记忆细胞^[43]。

肿瘤细胞或肿瘤浸润基质细胞分泌的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是肿瘤生长和肿瘤部位免疫抑制的关键介质, Smad4参与TGF- β 信号转导途径, 因此将针对Smad4的siRNA与4-1BB核酸适配体缀合可以抑制TGF- β 信号转导, 帮助T细胞抵抗TME的免疫抑制作用, 增强疫苗和辐射诱导的抗肿瘤免疫反应^[44]。

信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在TME中

可以持续激活 CD4⁺调节性 T 细胞, 抑制 CD8⁺ T 细胞, 从而促进肿瘤细胞增殖、侵袭和维持免疫抑制环境^[45]。STAT3 siRNA 与 CTLA4 核酸适配体缀合可结合表达 CTLA4 的 T 细胞并下调其 STAT3, 激活肿瘤抗原特异性 T 细胞, 减少肿瘤相关 CD4⁺调节性 T 细胞的生成。CTLA4-STAT3 siRNA 在各种小鼠肿瘤模型中均能有效抑制肿瘤生长^[46]。

最近发现, 将 EpCAM 适配体与 siRNA 嵌合体连接使核酸适配体可以一次靶向递送多种 siRNA, 例如 EpCAM 适配体靶向递送 4 种 siRNA (Upf2、PARP1、CD47 和 MCL1) 能有效抑制 HER2⁺ 和三阴性乳腺癌小鼠模型中肿瘤的生长并增强肿瘤浸润性免疫细胞的抗肿瘤功能^[47]。

3.3 核酸适配体-纳米材料复合物

近年来核酸适配体与纳米材料的复合物已在癌症检测与治疗领域已取得一定成果, 纳米材料比表面积大可以增加核酸适配体的负载量并延长适配体的半衰期^[48]。例如, 将 4 个 PD-L1 适配体连接至同一 DNA 纳米结构上形成了四价 APT-HJ, 增加其生物稳定性、体内循环时间以及抗肿瘤效果^[49]。在纳米颗粒上偶联不同核酸适配体可实现多靶点治疗, 例如将 CD28 的适配体 CD28Apt7 与 CTLA-4 的适配体 Del60 组装在一个核酸支架上形成的多价纳米颗粒能促进 T 细胞的增殖并诱导其分泌 IL-2, 有效抑制黑素瘤小鼠肿瘤的生长^[50]。ENG-APT/MIP-10-LP 纳米胶囊因适配体 ENG-APT 而具备了靶向小鼠肿瘤血管内皮细胞的能力, 能有效抑制肿瘤血管的形成^[51]。

3.4 核酸适配体介导肿瘤细胞与免疫细胞相互作用

免疫细胞与肿瘤细胞间的相互作用是实现高效免疫治疗的重要环节, 将能特异性识别肿瘤细胞的核酸适配体锚定在免疫细胞膜表面, 可诱导免疫细胞进行靶向攻击, 提高免疫细胞的治疗效果, 并有望应用于过继性免疫治疗中。例如, 在永生巨细胞病毒特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞表面锚定 TD05 核酸适配体, 可使 T 细胞定向杀伤 Ramos 细胞^[52]。利用代谢标记法和点击化学反应将靶向 SGC-7901 胃癌细胞的适配体 S4F 修饰于 CD3⁺ T 细胞表面, 赋予其更强的肿瘤靶向性和杀伤性^[53]。类似的, 也可以利用核酸适配体对巨噬细胞和 NK 细胞表面进行修饰。在巨噬细胞膜表面修饰 Sgc8 核酸适配体增强了对 CCRF-CEM 细胞的捕获能力, 同时与抗癌药物联合治疗可增强对靶细胞的吞噬作

用^[54]。NK 细胞膜表面锚定 CD30 核酸适配体生成的 ApEn-NK 细胞能特异性结合表达 CD30 的淋巴瘤细胞并诱导其凋亡^[55]。经 TLS11a 适配体和 PD-L1 适配体修饰的 NK 细胞既能靶向攻击肝癌细胞又能抵抗 PD-1/PD-L1 免疫检查点的抑制作用, 增强 NK 细胞在实体瘤中的免疫治疗效果^[56]。最近, 研究人员将 DNA 适配体作为抗体的替代品, 构建了一种多价抗体模拟物 (polyvalent antibody mimic, PAM), 利用疏水插入的方法将 PAM 插入到 NK 细胞的细胞膜中, 使 NK 细胞有效地识别和捕获对应肿瘤细胞。该方法具有广谱性, 可以将任意感兴趣的适配体修饰于各种免疫细胞^[57]。与治疗风险大, 操作复杂的 CAR-T/NK 免疫疗法相比, 经核酸适配体修饰的免疫细胞更容易获得且毒副作用小, 极具临床应用潜力。

4 总结与展望

抗体在肿瘤免疫治疗的临床应用占主要地位, 但因其生产成本低, 质量受不同批次的影响, 且存在免疫原性可能会引发自身免疫毒性等问题限制了抗体治疗的长远发展。而与抗体相比核酸适配体具有以下优势有望在肿瘤免疫治疗中作为抗体的替代品发挥作用^[58]: a. 直接化学合成, 与基于细胞生产的抗体相比生产成本低, 储存期长且质量不受生产批次的影响。b. 分子质量小, 具有较高组织渗透率, 免疫原性低。c. 易于修饰, 可以与药物, siRNA 或纳米颗粒偶联以增强治疗效果。d. 具有可控的靶向治疗体系, 通过合理设计互补的寡核苷酸解毒剂可以逆转核酸适配体的活性^[59]。目前, 核酸适配体在肿瘤免疫治疗领域的研究主要分为两部分, 一是筛选具有免疫调节功能的核酸适配体, 二是将已筛选到的免疫相关核酸适配体与抗体、siRNA、纳米材料及免疫细胞相偶联, 参与肿瘤免疫调控。虽然核酸适配体在肿瘤免疫治疗领域的研究层出不穷, 但要应用于临床治疗还有许多问题需要克服。包括: a. 核酸适配体筛选周期长, 目前针对免疫相关受体筛选得到的有调节功能的核酸适配体的种类不多, 例如针对二代新型免疫检查点 CD47 还未筛选到相关具有生物学功能的适配体。这表明我们需要优化筛选过程, 一是缩短筛选周期, 尽可能快地筛选到具有高亲和力与高特异性的核酸适配体。二是思考在筛选过程中引入怎样的筛选压力才能获得具有生物学功能的核酸适配体。b. 核酸适配体往往需要经过化学修饰才能长时间发

挥抗肿瘤免疫的作用。目前对于核酸适配体修饰主要类型包括 5'-溴、2'-氨基、2'-氟、2'-O-甲基核苷酸、胆固醇和 PEG 修饰等。但近年来发现 PEG 也存在免疫原性,会影响核酸适配体药物的疗效并可能引发超敏反应^[60],因此还需开发更多安全的化学修饰方法。c. 核酸适配体与纳米材料的结合方式有待改进与优化,以满足日益增长的肿瘤免疫治疗需求。d. 经核酸适配体修饰的免疫细胞注入体内后并不能在体内增殖,因此发挥作用的时间有限,需要探索如何延长装备核酸适配体的免疫细胞发挥作用的时间。尽管核酸适配体在肿瘤免疫治疗领域还面临许多挑战,但随着对肿瘤免疫机制研究的不断深入,以及适配体筛选流程的逐渐成熟,核酸适配体有潜力发展为一种新型的肿瘤免疫治疗平台。

参 考 文 献

- [1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011, **480**(7378): 480-489
- [2] Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 2005, **125**(4): 629-637
- [3] Taefehshokr N, Baradaran B, Baghbanzadeh A, *et al.* Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology*, 2020, **225**(2): 151875
- [4] Inglis S, Shaw A, Koenig S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research & development. *Vaccine*, 2006, **24** (Suppl 3): 99-105
- [5] Madan R A, Gulley J L. Therapeutic cancer vaccine fulfills the promise of immunotherapy in prostate cancer. *Immunotherapy*, 2011, **3**(1): 27-31
- [6] Twomey J D, Zhang B. Cancer immunotherapy update: FDA-approved checkpoint inhibitors and companion diagnostics. *AAPS J*, 2021, **23**(2): 39
- [7] Wei S C, Duffy C R, Allison J P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery*, 2018, **8**(9): 1069-1086
- [8] Morita Y, Leslie M, Kameyama H, *et al.* Aptamer therapeutics in cancer: current and future. *Cancers*, 2018, **10**(3): 80
- [9] Baker D E. Current FDA-related drug information new drugs approved by the FDA; new dosage forms and indications; agents pending FDA approval; significant labeling changes related to safety. *Hosp Pharm*, 2004, **39**(9): 880-894
- [10] Santulli-Marotto S, Nair S K, Rusconi C, *et al.* Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res*, 2003, **63**(21): 7483-7489
- [11] Huang B T, Lai W Y, Chang Y C, *et al.* A CTLA-4 antagonizing DNA aptamer with antitumor effect. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, **8**: 520-528
- [12] Prodeus A, Abdul-Wahid A, Fischer N W, *et al.* Targeting the PD-1/PD-L1 immune evasion axis with DNA aptamers as a novel therapeutic strategy for the treatment of disseminated cancers. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, **4**(4): e237
- [13] Wang H, Lam C H, Li X, *et al.* Selection of PD1/PD-L1 X-aptamers. *Biochimie*, 2018, **145**: 125-130
- [14] Khedri M, Abnous K, Rafatpanah H, *et al.* Development and evaluation of novel aptamers specific for human PD1 using hybrid systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Immunol Invest*, 2020, **49**(5): 535-554
- [15] Gao T, Pei R. Isolation of DNA aptamer targeting PD-1 with an antitumor immunotherapy effect. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, **3**(10): 7080-7086
- [16] Lai W Y, Huang B T, Wang J W, *et al.* A novel PD-L1-targeting antagonistic DNA aptamer with antitumor effects. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, **5**(12): e397
- [17] Wu X, Li F, Li Y, *et al.* A PD-L1 aptamer selected by Loss-Gain Cell-SELEX conjugated with paclitaxel for treating triple-negative breast cancer. *Medical Science Monitor*, 2020, **26**: e925583
- [18] Gao T, Mao Z, Li W, *et al.* Anti-PD-L1 DNA aptamer antagonizes the interaction of PD-1/PD-L1 with antitumor effect. *J Mater Chem B*, 2021, **9**(3): 746-756
- [19] Li X, Li Z, Yu H. Selection of threose nucleic acid aptamers to block PD-1/PD-L1 interaction for cancer immunotherapy. *Chem Commun*, 2020, **56**(93): 14653-14656
- [20] Li J, Ren X, Zhao J, *et al.* PD-L1 aptamer isolation via Modular-SELEX and its applications in cancer cell detection and tumor tissue section imaging. *Analyst*, 2021, **146**(9): 2910-2918
- [21] Pastor F. Immune-checkpoint blockade aptamers as a feasible clinical alternative to monoclonal antibodies. *Cancer Cell Microenvironment*, 2016, **3**: e1247
- [22] Gefen T, Castro I, Muharemagic D, *et al.* A TIM-3 oligonucleotide aptamer enhances T cell functions and potentiates tumor immunity in mice. *Mol Ther*, 2017, **25**(10): 2280-2288
- [23] Martinez Soldevilla M, Hervas S, Villanueva H, *et al.* Identification of LAG3 high affinity aptamers by HT-SELEX and conserved motif accumulation (CMA). *PLoS One*, 2017, **12**(9): e0185169
- [24] Mcnamara J O, Kolonias D, Pastor F, *et al.* Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J Clin Invest*, 2008, **118**(1): 376-386
- [25] Dollins C M, Nair S, Boczkowski D, *et al.* Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem Biol*, 2008, **15**(7): 675-682
- [26] Pratico E D, Sullenger B A, Nair S K. Identification and characterization of an agonistic aptamer against the T cell costimulatory receptor, OX40. *Nucleic Acid Ther*, 2013, **23**(1): 35-43
- [27] Soldevilla M M, Villanueva H, Bendandi M, *et al.* 2-fluoro-RNA oligonucleotide CD40 targeted aptamers for the control of B lymphoma and bone-marrow aplasia. *Biomaterials*, 2015, **67**: 274-285
- [28] Pastor F, Soldevilla M M, Villanueva H, *et al.* CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, **2**: e98

- [29] Sung H J, Choi S, Lee J W, *et al.* Inhibition of human neutrophil activity by an RNA aptamer bound to interleukin-8. *Biomaterials*, 2014, **35**(1): 578-589
- [30] Vater A, Sahlmann J, Kroeger N, *et al.* Hematopoietic stem and progenitor cell mobilization in mice and humans by a first-in-class mirror-image oligonucleotide inhibitor of CXCL12. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, **94**(1): 150-157
- [31] Liu S C, Alomran R, Chernikova S B, *et al.* Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. *Neuro Oncol*, 2014, **16**(1): 21-28
- [32] Zboralski D, Hoehlig K, Eulberg D, *et al.* Increasing tumor-infiltrating T cells through inhibition of CXCL12 with NOX-A12 synergizes with PD-1 blockade. *Cancer Immunol Res*, 2017, **5**(11): 950-956
- [33] Halama N, Pruefer U, Froemming A, *et al.* Phase I/II study with CXCL12 inhibitor NOX-A12 and pembrolizumab in patients with microsatellite-stable, metastatic colorectal or pancreatic cancer. *Ann Oncol*, 2019, **30**: v231
- [34] Kacherovsky N, Cardle I I, Cheng E L, *et al.* Traceless aptamer-mediated isolation of CD8+ T cells for chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Nat Biomed Eng*, 2019, **3**(10): 783-795
- [35] Sylvestre M, Saxby C P, Kacherovsky N, *et al.* Identification of a DNA aptamer that binds to human monocytes and macrophages. *Bioconjug Chem*, 2020, **31**(8): 1899-1907
- [36] Pastor F, Kolonias D, Mcnamara J O, II, *et al.* Targeting 4-1BB costimulation to disseminated tumor lesions with bi-specific oligonucleotide aptamers. *Mol Ther*, 2011, **19**(10): 1878-1886
- [37] Schrand B, Berezhnoy A, Brennenman R, *et al.* Targeting 4-1BB costimulation to the tumor stroma with bispecific aptamer conjugates enhances the therapeutic index of tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Res*, 2014, **2**(9): 867-877
- [38] Martinez Soldevilla M, Villanueva H, Casares N, *et al.* MRP1-CD28 bi-specific oligonucleotide aptamers: target costimulation to drug-resistant melanoma cancer stem cells. *Oncotarget*, 2016, **7**(17): 23182-23196
- [39] Boltz A, Piater B, Toleikis L, *et al.* Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis. *J Biol Chem*, 2011, **286**(24): 21896-21905
- [40] Li Z, Hu Y, An Y, *et al.* Novel bispecific aptamer enhances immune cytotoxicity against MUC1-positive tumor cells by MUC1-CD16 dual targeting. *Molecules*, 2019, **24**(3): 478
- [41] Yang Y, Sun X, Xu J, *et al.* Circular bispecific aptamer-mediated artificial intercellular recognition for targeted T cell immunotherapy. *ACS Nano*, 2020, **14**(8): 9562-9571
- [42] Berezhnoy A, Castro I, Levay A, *et al.* Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity. *J Clin Invest*, 2014, **124**(1): 188-197
- [43] Rajagopalan A, Berezhnoy A, Schrand B, *et al.* Aptamer-targeted attenuation of IL-2 signaling in CD8+ T cells enhances antitumor immunity. *Mol Ther*, 2017, **25**(1): 54-61
- [44] Puplampu-Dove Y, Gefen T, Rajagopalan A, *et al.* Potentiating tumor immunity using aptamer-targeted RNAi to render CD8+ T cells resistant to TGF β inhibition. *Oncoimmunol*, 2018, **7**(4): e1349588
- [45] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T H, *et al.* Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 2005, **11**(12): 1314-1321
- [46] Herrmann A, Priceman S J, Kujawski M, *et al.* CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *J Clin Invest*, 2014, **124**(7): 2977-2987
- [47] Zhang Y, Xie X, Yeganeh P N, *et al.* Immunotherapy for breast cancer using EpCAM aptamer tumor-targeted gene knockdown. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(9): e2022830118
- [48] Yang L, Zhang X, Ye M, *et al.* Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(14-15): 1361-1370
- [49] Li T, Yao F, An Y, *et al.* Novel complex of PD-L1 aptamer and holliday junction enhances antitumor efficacy *in vivo*. *Molecules*, 2021, **26**(4): 1067
- [50] Bai C, Gao S, Hu S, *et al.* Self-assembled multivalent aptamer nanoparticles with potential CAR-like characteristics could activate T cells and inhibit melanoma growth. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, **17**: 9-20
- [51] Yang X, Zhao J, Duan S, *et al.* Enhanced cytotoxic T lymphocytes recruitment targeting tumor vasculatures by endoglin aptamer and IP-10 plasmid presenting liposome-based nanocarriers. *Theranostics*, 2019, **9**(14): 4066-4083
- [52] Xiong X, Liu H, Zhao Z, *et al.* DNA aptamer-mediated cell targeting. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(5): 1472-1476
- [53] Liu C G, Wang Y, Liu P, *et al.* Aptamer-T cell targeted therapy for tumor treatment using sugar metabolism and click chemistry. *ACS Chem Biol*, 2020, **15**(6): 1554-1565
- [54] Sugimoto S, Iwasaki Y. Surface modification of macrophages with nucleic acid aptamers for enhancing the immune response against tumor cells. *Bioconjug Chem*, 2018, **29**(12): 4160-4167
- [55] Yang S, Wen J, Li H, *et al.* Aptamer-engineered natural killer cells for cell-specific adaptive immunotherapy. *Small*, 2019, **15**(22): 1900903
- [56] Zhang D, Zheng Y, Lin Z, *et al.* Equipping natural killer cells with specific targeting and checkpoint blocking aptamers for enhanced adoptive immunotherapy in solid tumors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(29): 12022-12028
- [57] Shi P, Wang X, Davis B, *et al.* *In situ* synthesis of an aptamer-based polyvalent antibody mimic on the cell surface for enhanced interactions between immune and cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(29): 11892-11897
- [58] Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, **16**(3): 181-202
- [59] Bompiani K M, Woodruff R S, Becker R C, *et al.* Antidote control of aptamer therapeutics: the road to a safer class of drug agents. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, **13**(10): 1924-1934
- [60] Moreno A, Pitoc G A, Ganson N J, *et al.* Anti-PEG antibodies inhibit the anticoagulant activity of PEGylated aptamers. *Cell Chem Biol*, 2019, **26**(5): 634-644

Research Progress of Aptamer-mediated Tumor Immunotherapy*

ZHOU Ling-Li, YE Mao**

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Tumor immunotherapy is a novel strategy for cancers, which has great significance and application prospects in clinical treatment. It mainly includes adoptive cell therapy, tumor vaccines and monoclonal antibody therapy. Antibodies are widely used in tumor immunotherapy, but their price is too high, the quality is easily influenced by different batches and have immunogenicity. Aptamers, also known as “chemical antibodies”, are short single-stranded oligonucleotides which bind to their targets with high specificity and affinity. Aptamers which have low immunogenicity, are synthesized at low cost and quality stability. Based on these advantages, aptamers have been developed for tumor immunotherapy in recent years which mainly includes two aspects. One is to select immune-related aptamers, and the other is to expand the application of aptamers that have been reported to tumor immunotherapy. Using immune checkpoints, co-stimulatory receptors or cytokines as targets, the aptamers can be obtained through screening. However, it is uncertain whether the aptamer has the biological function of regulating the anti-tumor immune response. Therefore, the process of screening should be improved by adding appropriate screening pressure to obtain functional aptamers that can regulate antitumor immune response. There are many aptamers which have been reported, but rarely have been investigated for further research and application. So we can further develop these aptamers for tumor immunotherapy. For example, aptamers can be coupled with siRNA or nanomaterials to indirectly regulate tumor immune processes. The modification of membrane of immune cells with aptamers confers the immune cells targeted tumor-killing effects. Aptamers play an important role in tumor immunotherapy in a variety of ways, and have great potential to be developed for clinical treatment. We need to improve the aptamer screening process to obtain aptamers that have powerful biological functions quickly and maximize the use of the aptamers that have been obtained.

Key words aptamers, tumor immunotherapy, immune checkpoints, co-stimulatory receptors, bispecific aptamers

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0195

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81672760) and Hunan Provincial Research Foundation for Key Research (2018SK2128).

** Corresponding author.

Tel: 86-731-88821834, E-mail: goldleaf@hnu.edu.cn

Received: July 5, 2021 Accepted: August 9, 2021